

University of Groningen

Ligand-mediated transport of drug delivery devices across the blood-brain barrier

Georgieva, Julia Valerieva

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2012

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Georgieva, J. V. (2012). *Ligand-mediated transport of drug delivery devices across the blood-brain barrier*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Appendices



Appendix A

Nederlandse Samenvatting



De bloed-hersenbarrière (BBB) belet het transport van veel medicijnen vanuit het bloed naar het centrale zenuwstelsel, en in het bijzonder dat van biologische macromoleculen, zoals eiwitten, peptiden en nucleïnezuuren, die een opkomende klasse van therapeutica vertegenwoordigen. In het huidige werk onderkennen we het probleem dat de BBB vormt voor medicijnafgifte in de hersenen en introduceren een nieuw type drug afgiftesysteem, G23-polymersomen, nanopartikels met hoge transcytotische capaciteit om medicijnen naar de hersenen te vervoeren.

Het is bekend dat door nanopartikels te voorzien van weefsel-specifieke liganden deze naar bepaalde organen/weefsels kunnen worden gestuurd (getarget), wat de biobeschikbaarheid van een in het nanopartikel opgesloten medicijn vergroot. Echter, de hersenen zijn ontoegankelijk vanuit de bloedcirculatie, en voor medicijnafgifte in de hersenen kunnen nanopartikels beter worden bedekt met liganden die niet het hersenweefsel (neuronen, oligodendrocyten en astrocyten) maar het hersenendotheel (de BBB) herkennen.

Liganden die binden aan natuurlijke transporteiwitten en receptoren op de BBB kunnen worden gebruikt om medicijnen naar de hersenen te vervoeren (**Hoofdstuk 2**). Opmerkelijk is dat diezelfde transporteiwitten en receptoren vaak door ziekteverwekkers worden geëxploiteerd om cellen binnen te dringen. Men heeft laten zien dat met behulp van antilichamen tegen de transferrine-receptor medicijnen in het BBB endotheel kunnen worden afgeleverd. Echter, alhoewel de transferrinereceptor overvloedig aanwezig is op hersenendotheel, is deze niet hersenspecifiek, en komt het medicijn dus ook op andere plekken in het lichaam terecht, waar het niet nodig of zelfs schadelijk is. Het targeten van de insulinereceptor, wat geclaimd wordt als een therapeutische werkzame strategie voor medicijnafgifte in de hersenen, kent een ander probleem. Aangezien het binden van medicijnen aan de insulinereceptor aanleiding kan geven tot het verdwijnen van deze receptor aan de bloedkant van de BBB, bestaat het risico op verstoring van het glucose metabolisme in de hersenen. Met een andere klasse van liganden, de zogenaamde angiopeps, die binden aan LDL receptor-verwant proteïne (LRP), werden al succesvolle klinische studies gedaan ter behandeling van glioom d.m.v. intraveuze toediening van angiopep-paclitaxel complexen. Of de opname van paclitaxel in de hersenen werkelijk via LRP plaatsvindt, en of LRP dus een goede targetreceptor is, moet nog worden onderzocht.

Het moge duidelijk zijn dat er voor een succesvolle afgifte van medicijnen in de hersenen receptoren moeten worden getarget die specifiek zijn voor het hersenendotheel, die aan de bloedkant beschikbaar zijn voor binding, en die nanopartikels kunnen transporteren zonder het transport van natuurlijke liganden te verstoren. Het werk dat beschreven wordt in dit proefschrift concentreert zich op het vinden van receptoren, die -tezamen met de bijbehorende liganden-, in de cel worden gesorteerd voor transcytose, d.w.z. getransporteerd worden via een transcellulaire route van de bloedzijde (luminaal) naar de weefselzijde (abluminaal) van het hersenendotheel.

De transcellulaire transportroute over hersenendotheel is in verband ge-

bracht met initiële opname via caveolae, een opnameroute die transport naar lysosomen, en daarmee afbraak, vermijdt. Ook is bekend dat glycosylphosphatidyl-geankerde proteïnen (GPI-APs) getransporteerd kunnen worden via transcytose. De mogelijkheden om caveolae en GPI-APs in hersenendotheel te targeten ten behoeve van transendotheliaal transport werden verder onderzocht. Als eerste, identificeerden wij met behulp van massaspectrometrie (**Hoofdstuk 3**) 33 GPI-APs in hCMEC/D3 humane hersenendotheelcellen. De weefseldistributie van één van de geïdentificeerde GPI-APs, prionproteïne (PrP), toont specificiteit voor de bloedcapillairen in de hersenen, en het centrale zenuwstelsel. Bovendien, wordt exogeen toegediend prion opgenomen in zenuwcellen en is de verspreiding in het CNS afhankelijk van homotypische interacties met endogeen prion. Al deze gegevens samen rationaliseerden onze verdere studies aan het prionproteïne als een potentiële receptor (en ligand) voor medicijnafgifte in de hersenen.

Het transcellulair vesiculair transport in BBB endotheel kan worden onderverdeeld in twee klassen: receptor-gemedieerde en adsorptieve (ladings-gemedieerde) transcytose. Deze transport mechanismen dienen voor import en export van nutriënten en metabolieten in de hersenen, en kunnen mogelijk bijdragen aan de afgifte van nanopartikels in de hersenen. Echter, het mechanisme van transcytose in endotheelcellen is onduidelijk. Om meer duidelijkheid hierover te krijgen werd in **Hoofdstuk 4** het transport van nanopartikels in een in vitro model van de BBB bestudeerd. 500 nm nanopartikels (NBs) werden in de caveolaire opnameroute gestuurd vanwege hun specifieke diameter. Daarnaast werd prion covalent gebonden aan het oppervlak van nanopartikels (PrPBs) om receptor-gemedieerde opname te induceren, terwijl opname via de adsorptieve route werd getriggerd door nanopartikels met een positieve lading (PEIBs). PrPBs vertoonden de hoogste transcytotische activiteit over de in vitro BBB ($6.0 \pm 0.9\%$), gevolgd door NBs met $3.4 \pm 0.3\%$. De opname van PrPBs en NBs werd voornamelijk geïnhibeerd wanneer de functie van caveolae werd verstoord d.m.v. farmaceutische middelen. De intracellulaire compartimenten waarin PrPBs en NBs werden gevonden, verschilden echter aanzienlijk van elkaar. PrPBs accumuleerden in een sorteringscompartiment, positief voor zowel clathrine als caveoline, zoals aangetoond m.b.v. immunofluorescentie en elektronenmicroscopie, terwijl NBs in multivesiculaire bodies (MVBs) en multilamellaire structuren werden aangetoond. Interessant is dat transcellulair transport van low-density lipoproteïnen (LDLs) over de BBB, caveolae-afhankelijk is en ook via MVBs plaatsvindt. Transcytose van PEIBs was slechts $1.3 \pm 0.6\%$. Ondanks dat de positieve lading de opname van de nanopartikels door de endotheelcellen sterk verhoogde, bleven de PEIBs 'gevangen' in cellulaire vacuoles, en leidt een ladings-gemedieerde verhoging in de opname klaarblijkelijk niet tot eenzelfde verhoging in transcytose. Deze resultaten duiden op de betrokkenheid van receptor-gemedieerd transport van nanopartikels via een caveolaire route ten behoeve van transcellulaire afgifte. De morfologisch verschillende sorteringscompartimenten en MVBs vertegenwoordigen -tenminste gedeeltelijk-

de verzameling van transcytotische compartimenten in de cel.

Vanwege het feit dat endogeen prionproteïne een mogelijk goede receptor is voor nanopartikel afgifte in de hersenen, selecteerden we nieuwe prion-bindende liganden uit een 12-aminozuur peptide faagbibliotheek (**Hoofdstuk 5**). In tegenstelling tot proteïnen, zijn peptiden gemakkelijk te produceren en vereisen ze geen modificaties, zoals bijvoorbeeld bij humanisering van antilichamen het geval is, wanneer proefdierstudies moeten worden vertaald naar therapieën in de mens. Naast prion-bindende liganden werden ook liganden geselecteerd met affiniteit voor monosialoganglioside GM1, een lipide dat verrijkt is in caveolae. Twee prion-bindende (Pcs, P9) en twee GM1-bindende (G88 en G23) peptides werden gekoppeld aan het oppervlak van polymersomen (polymere nanopartikels) en het transport van deze peptide-getargete polymersomen over een in vitro model van de bloed-hersenbarrière werd gemeten. Het GM1-bindende G23 peptide bevorderde sterk de transcytose van G23-polymersomen. $30.8 \pm 1.4\%$ van de lumaal toegediende dosis bereikte de abluminale kant van de in vitro BBB, wat een viervoudige toename is t.o.v. de transcytose van alle andere peptide-getargete polymersomen. In tegenstelling tot onze verwachtingen, veroorzaakten de prion-bindende peptiden Pcs en P9 nauwelijks transcytose van de polymersomen, d.w.z. transcytose was van dezelfde orde van grootte als dat van niet-getargete polymersomen ($5.7 \pm 0.8\%$). Interessant genoeg, was ook het TAT-peptide, wat verantwoordelijk wordt gehouden voor de transcytose van HIV, niet in staat het transport van polymersomen over de BBB te stimuleren ($7.2 \pm 1.2\%$), alhoewel het de cellulaire associatie (binding plus opname) wel verhoogde. De sterke cellulaire associatie van TAT-polymersomen kan verklaard worden door hun sterke positieve lading, net zoals in het geval van de PEIBs. Dit bevestigt dat een toename in de opname van nanopartikels door hersenenendotheelcellen die geïnduceerd wordt door een positieve lading, niet noodzakelijkerwijs leidt tot een toename van hun transcytose.

Medicijnafgifte in de hersenen door het gebruik van ligand-getargete nanopartikels, zal een ligand vereisen dat niet alleen de transcytose van nanoparticles veroorzaakt, maar allereerst hun accumulatie in de hersencapillairen in vivo bewerkstelligt. Van RI7217-nanopartikels is beschreven dat ze accumuleren in de hersenvasculatuur. Daarom werd in een biodistributiestudie de accumulatie van de GM1-bindende G23-polymersomen in de hersenen vergeleken met die van de transferrine receptor-bindende RI7217-polymersomen, na intraveneuze toediening in BALB/c muizen. De G23-polymersomen en RI7217 polymersomen vertoonden een vergelijkbare accumulatie in de hersenen, die significant hoger was dan dat van polymersomen met een gescrambelde versie van het G23-peptide, wat aantoont dat het G23-peptide een specifiek ligand is met een vergelijkbaar vermogen tot het in vivo targeten naar de hersenen als het RI7217-antilichaam.

De succesvolle ontwikkeling van nanopartikels voor medicijnafgifte in de hersenen wordt bemoeilijkt door de beperkte kennis van het mechanisme van transcytose over de BBB. Het in kaart brengen van de intracellulaire transport

route van G23-polymersomen, die binding aan hersenenendotheel in vivo laten zien en ook een transcytotische activiteit vertonen, kan mechanistisch inzicht in het proces van transcytose geven wat essentieel is voor een optimaal ontwerp van nanoformuleringen met verbeterde BBB penetratie. Als zodanig zijn de hier beschreven G23-polymersomen een uitstekend model om het proces van transcytose in hersenenendotheelcellen te ontrafelen. In **Hoofdstuk 6** werden de eerste stappen om de transportroute van G23-polymersomen in kaart te brengen, gezet. Wij vermoeden dat G23 aanleiding kan geven tot lokale clustering van bepaalde lipiden (GM1, GT1b) in de plasmamembraan, gevolgd door het instulpen en afsnoeren van de membraan. Internalisatie van de zo gevormde vesikels zou kunnen leiden tot de vorming van MVBs, structuren waarvan men heeft aangetoond dat ze een rol kunnen spelen in transcytose. Wij pleiten dat de zoektocht naar receptoren voor het targeten van medicijnen naar de hersenen zich niet langer beperkt tot transportproteïnen, zoals tot nu toe gedaan is, maar ook de glyco(sphingo)lipiden omvat. Een bijkomend voordeel van het targeten van lipiden i.p.v. proteïnen is dat lipiden gelijk zijn tussen de verschillende soorten van dieren, en de mens, waardoor resultaten behaald met diermodellen direct vertaald kunnen worden naar de kliniek, zonder de noodzaak van het maken van soort-specifieke targeting peptides/antilichamen. Zowel de hersenspecificiteit als de transcytotische activiteit van receptoren, welke nodig zijn voor respectievelijk de accumulatie in de hersenen en het transport van nanopartikels over de BBB, verdienen de aandacht.

Tenslotte kan de natuurlijke capaciteit van neurale stamcellen (NSCs) om de bloed-hersenbarrière te passeren, gebruikt worden in de behandeling van neurologische stoornissen (**Hoofdstuk 7**). Echter, systemisch toegediende stamcellen kunnen weggevangen worden door organen met een hoge bloedtoevoer, zoals hart, longen en lever, wat kan leiden tot complicaties. Om dit nadeel van celtherapie te ondervangen, maar toch gebruik te kunnen maken van de natuurlijke affiniteit van NSCs voor de hersenen, onderzochten wij ten slotte de mogelijkheid om plasmamembraan vesikels (PMVs) die gemaakt werden van NSCs, te gebruiken als alternatief afgiftesysteem voor de hersenen. NSC-PMVs vertoonden na systemische toediening inderdaad een hoge affiniteit voor de hersenen tezamen met een significante accumulatie in het hersenweefsel, wat hun transcytotische capaciteit aantoonde. In vitro was de transcytotische capaciteit van de PMVs vergelijkbaar met die van bovengenoemde G23-polymersomen.

In conclusie, het targeten van nanopartikels naar natuurlijke glycolipiden alsmede het gebruik van NSC-PMVs creëert, gebruik makende van natuurlijke biologische processen, interessante nieuwe mogelijkheden voor medicijnafgifte in de hersenen.

Резюме



Хранителните вещества и лекарствата, които попадат в системното кръвообращение, могат свободно да преминават в прилежащите тъкани, но не и към централната нервна система (ЦНС). В действителност, обратно на много други тъкани, хомеостазата в мозъка е стриктно регулирана. По този начин невроните, които представляват 90 % от всички клетки в мозъка, биват запазени от потенциално токсични молекули, като същевременно се осигурява оптимална доставка на глюкоза, кислород и други регулаторни и хранителни вещества. От съществено значение при изпълнението на тази двойна роля, т.е. прецизен контрол върху веществата, които достигат ЦНС или биват обратно експортирани в кръвообращението, е кръвно-мозъчната бариера (КМБ), която е изградена от плътно прилепени ендотелни клетки, базална мембрана и терминални участъци на прилежащите астроцити (виж глава 1, фигура 1). Различни молекули, в зависимост от техните физико-химични свойства, могат да навлязат в ендотелните клетки на КМБ чрез дифузия през апикалната мембрана (която изгражда лумена на кръвоносния съд), чрез улеснен транспорт през специфични транспортни молекули или посредством процес на интернализация, свързан с вътреклетъчния транспорт (виж глава 2, фигура 1). Още на апикалната мембрана обаче се намират първите защитни механизми, т.нар. експортни помпи — мембранни гликопротеини, кодирани от гените за множествена лекарствена резистентност, които, след активиране от АТФ, изпомпват обратно в кръвообращението множество вещества. Дори молекули, които не са субстрати на протонните помпи и успеят да преминат тази първа защитна линия, за да достигнат до базолатералната мембрана (която е в контакт с мозъчните клетки) и накрая да навлязат в мозъчния тъкан, трябва да бъдат транспортирани през клетката по маршрут, който избягва срещата с разграждащи ензими.

По този начин КМБ не само защитава невроните и другите клетки в ЦНС от влиянието на токсични вещества, но и значително възпрепятства навлизането на лекарствени молекули и затруднява терапията на заболявания като болест на Паркинсон, болест на Алцхеймер и мозъчни тумори. С много малко изключения съвременните лекарства, които се използват за лечението на неврологични и психиатрични заболявания, достигат ЦНС чрез пасивна дифузия. При това тези вещества трябва да са мастноразтворими, с ниска молекулна маса (< 500 Da) и ограничен брой функционални групи, способни да образуват водородни връзки. В действителност повечето от лекарствата, които се употребяват в терапията на мозъчни заболявания, са деривати на вещества с естествен произход или синтетични молекули със случайно открита активност (барбитурати, бензодиазепини). След като са известни функционалните групи, носители на фармакологичното действие, физико-химичните и фармакокинетичните свойства на лекарственото вещество могат да бъдат допълнително модифицирани с цел по-добра проникваема способност през КМБ. Например с ацетилирането на морфин до хероин се увеличава фармакологичният отговор, което се дължи на повишената липофилност на хероина спрямо морфина, неговата улеснена дифузия и по-висока бионаличност.

В случая с морфина обаче ниската бионаличност се компенсира от неговата потентност, т.е. силен фармакологичен ефект. На същите критерии се базира и успешният маркетинг на антидепресантите fluoxetine и sertraline.

Към момента са познати почти 1000 гени и дегенеративни заболявания, които засягат мозъка. При това напредналите технологии при терапията на тези заболявания целят цялостно лечение, като адресират молекулярните причини, а не целят просто овладяване на симптомите. Въпреки че малки хидрофобни молекули често са достатъчни за симптоматично лечение на психологични разстройства, обещаващи нови подходи се основават на регулация на генната експресия в засегнатите неврони. Така терапевтични единици се явяват протеини, антитела или микроРНК-и. Успоредно с въвеждането на биотехнологични продукти като носители на фармакологичното действие се налага и разработването на подходящи лекарствени форми, които да осигуряват транспорта им от мястото на приложение до мястото на действие, като същевременно запазват тяхната структурна и функционална цялост. Така например при орално приложение лекарствените молекули с биологичен произход трябва да са резистентни на действието на храносмилателните ензими. Интравенозното приложение крие риск от активиране на имунната система или инактивиране на био-лекарството вследствие на свързване със серумните протеини. Освен това, за да се осигури оптимална бионаличност тези молекули трябва свободно да преминават през биологичните мембрани. Оптимална бионаличност може да се постигне и чрез стимулирано натрупване на био-лекарството в мястото на действие — т.нар. таргетиране, като по този начин се намалява и рискът от нежелани лекарствени реакции, породени от неблагоприятно тъканно разпределение.

Всички тези изисквания и предизвикателства при разработването на лекарствени форми за биотехнологични лекарства се разглеждат в научната област, позната като наномедицина. Доставянето на лекарствени вещества през КМБ до ЦНС с помощта на носители — насочени наночастици — преминава през няколко етапа (виж глава 1, фигура 2). Лекарственото вещество обикновено се загражда в кухината на наночастицата като разтвор или се вгражда в хидрофобната обвивка, като наночастиците могат да бъдат изградени от липиди или амфифилни полимери. След като наночастиците попаднат в системното кръвообращение, специфичното им насочване към ендотелните клетки на КМБ се осигурява посредством лиганди, прикрепени към тяхната повърхност. Тези лиганди разпознават специфични за КМБ рецептори, които след активиране се поглъщат от клетката заедно с наночастицата и навлизат в трансклетъчния път, познат като трансцитоза. Накрая наночастиците напускат клетката чрез екзоцитоза през противоположната мембрана, т.е. освобождават се в мозъчната тъкан.

Целта на описаната работата беше да се идентифицират нови трансцитозни рецептори на КМБ и техните съответстващи лиганди, които позволяват разработването на подобрени наноносители за специфично доставяне на лекарствени вещества в ЦНС. Предлага се нов лекарствен носител — G23-полимерзоми

– полимерни наночастици с висок капацитет да транспортират лекарства в мозъчната тъкан чрез трансцитоза през кръвно-мозъчната бариера (КМБ). В момента лиганди, които се свързват с естествените транспортни молекули и рецептори на КМБ, се използват за транспортирането на лекарство-съдържащи наночастици в мозъчната тъкан (Глава 2). Антителата, произведени, за да взаимодействат с рецептора на трансферина, при това в епитоп, различен от естественият лиганд — трансферин, предизвикват натрупване на лекарство-лиганд комплекса в ендотелните клетки на КМБ. Въпреки това рецепторът на трансферин е повсеместно разпространен в цялото тяло и не притежава специфичност за КМБ. По подобен начин лигандите, които се свързват с инсулиновия рецептор, успешно пренасят лекарствени молекули през КМБ, но същевременно предизвикват ендоцитоза на инсулиновите рецептори и съответно могат да нарушат глюкозния метаболизъм в ЦНС. Друг клас от лиганди, т. нар. Ангипептиди, които се свързват с протеина, отнасящ се до нископлътностния липопротеин рецептор (LRP), вече са в процес на клинични проучвания за лечение на глиома под формата на комплекс Angioprepacitaxel за интравенозно приложение. В действителност LRP се намира на базолатералната мембрана на ендотелните клетки, т.е. е невидим за лиганди в кръвта при физиологични условия и съответно LRP-зависим пренос на комплекса е малко вероятен. Очевидна е необходимостта от нови рецептори на КМБ, които са специфични, експресирани са на апикалната мембрана, т.е. откъм лумена на кръвоносния съд, и имат потенциал да пренасят наночастици, без да нарушават транспорта на ендогенните лиганди. В работата, представена тук вниманието е съсредоточено върху търсене на рецептори, които, заедно със съответните им лиганди, се транспортират вътреклетъчно от апикалната до базолатералната страна през ендотелните клетки на КМБ чрез процеса на трансцитоза.

Трансклетъчният транспорт през ендотелните клетки на КМБ вероятно произхожда от ендоцитоза през мембранни структури, наречени кавеоле, тъй като се предполага, че по този начин се избягва доставянето на пренасяното вещество в лизозомите и неговото ензимно разграждане. Друга възможност представлява специфичният механизъм на ендоцитоза на протеините, свързани към клетъчната мембрана посредством гликозил фосфатидилинозитол (GPI-APs), които след интернализация в клетката се рециклират обратно до клетъчната мембрана и по този начин избягват вътреклетъчното смятане в лизозомите. Посредством мас-спектрометрия бяха идентифицирани 33 (Глава 3) GPI-APs в човешката клетъчна линия hCMC/D3, която представлява удобен *in vitro* модел на КМБ. Тъканното разпределение на един от така намерените протеини, прион, е специфично за кръвно-мозъчните капиляри и ЦНС. Освен това екзогенният прион притежава невротропичност и неговото разпространение в ЦНС зависи от наличието на неговата ендогенна изоформа. Основавайки се на тези данни, беше изследван допълнително прионът като потенциален лиганд и едновременно рецептор за пренос на наночастици през КМБ в мозъчната тъкан.

Трансклетъчният везикуларен транспорт през ендотелните клетки на КМБ се разделя на два типа: рецептор-зависима и адсорбираща (заряд-зависима) транцитоза. Тези два механизма работят в две посоки, като осигуряват транспорта на хранителни вещества и метаболити от системното кръвообращение в мозъка и обратно. Точният механизъм на тези процеси обаче не е напълно изяснен. Този въпрос е засегнат в Глава 4, в която е описан трансклетъчният транспорт на повърхностно-изменени наночастици в *in vitro* модел на КМБ hCMEC/D3 клетки. Наночастици с диаметър 500 nm бяха насочени към кавеоле-зависима ендоцитоза посредством техния размер (не-таргетирани наночастици, НТНЧ). Допълнително прион беше ковалентно свързан към повърхността на наночастиците (прион-покрити наночастици, ППНЧ), за да провокира рецептор-зависима ендоцитоза, докато адсорбиращ транспорт беше стимулиран с наночастици (ПЕИНЧ), които носят положителен заряд на повърхността, дължащ се на полимера полиетиленмин. ППНЧ проявиха най-висок транцитозен потенциал ($6.0 \pm 0.9 \%$) през *in vitro* модела на КМБ, последвани от НТНЧ с $3.4 \pm 0.3 \%$. Ендоцитозата на ППНЧ и НТНЧ беше инхибирана в най-силна степен от вещества, които извличат наличния холестерол от клетъчната мембрана и по този начин нарушават целостта на кавеоле-структурите. Независимо от това вътреклетъчните структури, в които се натрупват ППНЧ и НТНЧ, се различават значително. ППНЧ достигат до т.нар. междинни вътреклетъчни отделения за сортиране на молекули, характеризирани с едновременно наличие на протеините кавеолин и клатрин чрез флуоресцентна и електронна микроскопия, докато НТНЧ се натрупват в мултивезикуларни телца и мутиламеларни структури. Интерес представлява фактът, че трансклетъчният транспорт на нископлътностен липопротеин — естествени частици с диаметър 22 nm — през КМБ е кавеоле-зависим и подобно преминава през формирането на мултивезикуларни телца. Транцитозата на ПЕИНЧ беше $1.3 \pm 0.6 \%$. Въпреки че положителният заряд съществено индуцира ендоцитозата на ПЕИНЧ, тези частици се задържат във вакуоли и следователно заряд-зависимата ендоцитоза е малко вероятна като входна врата за трансклетъчния транспорт на наночастици. В обобщение, тези резултати подкрепят кавеоле-зависимата ендоцитозата като възможен път за пренос на наночастици през КМБ от кръвообращението към ЦНС. При това особен интерес представляват междинните, сортиращи звена и мултивезикуларните телца в клетката като два органа, през които преминават веществата, насочени за пренос към ЦНС.

Позовавайки се на данните, подкрепящи ролята на прион протеина като рецептор за транспорт на наночастици, бяха екстрахирани нови лиганди, способни да се свързват с прион протеина, от библиотека, която съдържа 2×10^9 случайни 12-аминокиселинни пептида експресирани върху фаги, т.нар. phage display технология (Глава 5). Пептидите, за разлика от протеините, се произвеждат лесно, не изискват допълни изменения в молекулата, но най-вече при тях отпада необходимостта от хуманизиране, както е при антителата, което съществено скъсява времето за пренос на изследванията от лабораторни жи-

вотни върху хора. Посредством същата технология бяха селектирани лиганди с афинитет към моносиалоганглиозида GM1, съществен компонент на кавеоларната мембрана.

Два прион-свързващи (Pcs и P9) и два GM1-свързващи (G88 и G23) пептида бяха ковалентно прикачени към повърхността на полимерзоми (наночастици, изградени от полибутадиен) и транспортът на тези пептид-насочени наночастици беше измерен в нашата *in vitro* система.

Пептидът G23, който беше селектиран с афинитет към моносиалоганглиозида GM1, значително индуцира трансцитозата на G23-полимерзомите, която беше измерена като 30.8 ± 1.4 % от количеството, прибавено в апикалния отдел, т.е. 4 пъти по-висока стойност от всички други пептид-насочени полимерзоми. Обратно на нашите очаквания, прион-свързващите пептиди Pcs и P9 индуцират трансцитоза на съответните полимерзоми в ограничена степен, приблизително равна по стойност на тази на не-таргетираните наночастици. Интерес представлява и поведението на TAT-полимерзомите. TAT — пептид от вируса на СПИН, за който се знае, че прониква през клетъчните мембрани в голяма степен, не индуцира съществено трансцитозата на TAT-полимерзомите, въпреки високата степен на интернализация в клетката. Ефект, който, подобно на ПЕИНЧ, вероятно се дължи на повърхностния положителен заряд. И тук отново повишението в ендоцитозата на наночастиците в ендотелните клетки на КМБ не съответства задължително на тяхната трансцитоза.

Пренасянето на лекарства в мозъчната тъкан чрез лиганд-насочени наночастици изисква лиганди, които не само улесняват трансцитозата, но и стимулират натрупването на наночастици в ендотелните клетки на КМБ *in vivo*. Досега успешното натрупване в мозъчните капиляри е описано за RI7217-насочени липозоми, където RI7217 е антитяло срещу рецептора за трансферин. За това ние сравнихме биоразпределението на GM1-насочените G23-полимерзоми с това на RI7217-полимерзоми след интравенозна инжекция в BALB/c мишки. G23-полимерзомите акумулираха в мозъчната тъкан на мишки в степен подобна на тази на RI7217-полимерзомите, но значително по-висока от тази на полимерзоми, покрити с пептид, който има същият аминокиселинен състав като G23-пептида, но позицията на аминокиселините е разменена на случаен принцип. Тези резултати показват, че потенциалът на G23-пептида като лиганд за *in vivo* насочване на лекарства към мозъчната тъкан е сравним с този на RI7217-антитялото.

До момента липсата на достатъчно данни за механизма на трансцитоза през КМБ възпрепятства съществено разработването на наночастици за доставяне на лекарства в ЦНС. G23-полимерзомите, които проявяват афинитет към ендотелните клетки на мозъчните капиляри *in vivo* и притежават висока трансцитозна активност *in vitro*, представляват удобен модел за изучаване на процеса на трансцитоза. Познаването в детайли на вътреклетъчните органели, през които преминава транспортът на наночастици, може да спомогне за рационалното разработване на лекарствени форми с подобро проникване през КМБ.

Кинетичният профил на G23-полимерзомите представлява типична крива на насищане (Глава 6), което заедно с факта, че количеството на преминалите КМБ *in vitro* наночастици значително намалява, когато се редуцира броят на G23-молекулите или G23-пептида се замени с неговата разместена форма, в действителност подкрепя допускането за наличието на специфичен клетъчен рецептор в процеса на трансцитоза.

За да открием рецептора (рецепторите), отговорни за преноса на G23-полимерзомите, бяха проведени експерименти, в които GM1-ганглиозида беше блокиран от неговия естествен лиганд — холерния токсин. При това заедно с GM1-ганглиозида, GT1b беше идентифициран като предполагаем рецептор, отговорен за транспорта на G23-полимерзомите.

С времето G23-полимерзомите се натрупват в мултивезикуларни телца, където също попадат и нископлътностните липопротеини. Тези резултати допълнително подкрепят твърдението, че мултивезикуларните телца представляват междинна станция в трансклетъчния път през ендотелните клетки, подобно на транспорта на НТНЧ.

В момента се дискутира тезата, че различни патогени и токсини, например холерния или Shiga токсинът, са развили на еволюционно ниво общ механизъм на ендоцитоза. Първоначално при контакт с клетъчната мембрана инфекциозният агент предизвиква струпване на гликосфинголипиди, което провокира вдлъбване на клетъчната мембрана и последваща интернализация. По подобен механизъм G23-полимерзомите биха могли да предизвикат пре-организиране на мембраните липиди, което да доведе до формирането на мембранни вдлъбвания и вътреклетъчни везикули. Ендоцитозата на тези участъци от клетъчната мембрана подпомага сформиранието на мултивезикуларни телца, които са предназначени за екзоцитоза. Докато тук се разглежда предимно механизмът на трансцитоза през ендотелните клетки на КМБ, отворен остава въпросът за регулацията, която се осъществява в тези клетки при транспорта на различни вещества. Основавайки се на тези резултати, може да се предположи, че сортирането на дадено вещество за разграждане в лизозомите или трансцитоза през КМБ до мозъчната тъкан зависи не само от наличието на конкретен рецептор, но и от взаимодействието на този рецептор с близкостоящите липиди. Очевидно търсенето на рецептори за транспорт на наночастици през КМБ не бива да бъде ограничено само до транспортни молекули, както е досега, но може да се разшири и до други класове рецептори, напр. гликосфинголипиди, както е посочено в тази работа. Липидите не се променят между видовете и следователно не е необходимо производството на видовоспецифични антитела и/или лиганди, което допълнително улеснява прехода между лабораторни изследвания и клинични изпитвания. Независимо от това фокусът трябва да бъде върху специфичността за мозъчната тъкан и трансцитозния потенциал на даден рецептор, които са необходими както за натрупването в мозъчните капиляри, така и за транспорта на наночастици през КМБ.

Невроналните стволни клетки са описани като терапия за много неврологични заболявания (Глава 7). Въпреки това съществен недостатък при сис-

темното приложение на стволови клетки остава тяхното нежелано задържане в други богато кръвоснабдени органи, което може да предизвика опасни усложнения. За да избегнем негативите от клетъчна терапия, като същевременно използваме естественият афинитет на невроналните стволови клетки към мозъчната тъкан, накрая бяха изследвани везикули, приготвени от клетъчните мембрани на невронални стволови клетки като алтернативни носители на лекарствени вещества в мозъка. Така приготвените везикули се натрупват в значителна степен в мозъчните клетки след системно приложение. *In vitro* тези везикули показват трансцитозна активност, сравнима с тази на по-горе споменатите G23-полимерзоми.

В заключение, насочването на наночастици към естествените гликолипиди както и употребата на везикули, произведени от невронални стволови клетки, които са естествени биологични наноустройства, представляват нови, обещаващи стратегии в разработването на лекарствени форми с увеличена прониквателна способност през КМБ и съответно осигуряващи подобрена ЦНС бионаличност.

Appendix B

Formation and characterization of
peptide-targeted polymersomes

René P. Brinkhuis

Floris P. J. T. Rutjes

Jan C. M. van Hest



Materials

Copper bromide (CuBr) (FLUKA, >98 %), N,N,N',N',N''-pentamethyl diethylenetriamine (PMDETA) (Sigma Aldrich, 99 %), N,N'-diisopropylcarbodiimide (DIPCDI) (FLUKA, > 98 %), 1-Hydroxy-1H-benzotriazole hydrate (HOBt) (ALDRICH, wetted w. not less than 14 % water, 97 %), tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP) (Sigma Aldrich, >98 %), Gadolinium(II) diethylenetriaminepentaacetic acid, hydrate (Sigma Aldrich, > 98 %), Chelex 100 sodium form (Sigma Aldrich) were used as received. Tetrahydrofuran (THF) (ACROS ORGANICS, 99+ % extra pure, stabilized with BHT) was distilled under argon from sodium/benzophenone and triethyl amine (TEA) (BAKER) was distilled from calcium hydride under an argon atmosphere prior to use. Polymer extrusions were performed using 200 nm filters (Acrodisc 13 mm Syringe Filter, 0.2 μ m Nylon membrane) and 0.1 μ m PC membrane (WHATMAN). Dialysis was performed using Spectra/Por molecular porous membrane tubing (Spectrum Laboratories, Inc, 12-14.000 MWCO).

Instrumentation

MilliQ water was obtained from a Labconco water pro PS system. Thin layer chromatography (TLC) was performed on Merck precoated silica gel 60 F-254 plates (layer thickness 0.25 mm). Compounds were visualized by UV or permanganate reagent. Column chromatography (CC) was carried out using silica gel, Acros (0.035-0.070 mm, pore diameter ca. 6 nm). Proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR) spectra were recorded on a Varian Unity Inova 400 FTNMR spectrometer. Chemical shifts are expressed in parts per million (δ scale) relative to the internal standard tetramethylsilane ($\delta=0.00$ ppm). Molecular weight distributions were measured using size exclusion chromatography (SEC) on a Shimadzu (CTO-20A) system equipped with a guard column and a PL gel 5 μ m mixed D column (PolymerLaboratories) with differential refractive index and UV ($\lambda=254$ nm and $\lambda=345$ nm) detection, using tetrahydrofuran (Sigma Aldrich chromasolv 99.9 %) as an eluent at 1 ml/min and $T = 30^\circ\text{C}$. Particle size distributions were measured on a Malvern instruments Zetasizer Nano-S.

Synthesis and characterization

Polymers **1**, **2**, **5**, **6** and **7** were synthesized according to procedures as will be published elsewhere [1]. Maleimide reagent **9** was synthesized according to [2]. Prior to use, all polymers were extensively washed with Chelex 100 resin in THF to remove any traces of copper. The amount of residual copper was in all cases determined by ICP-MS and found to be equal or less than MilliQ references.

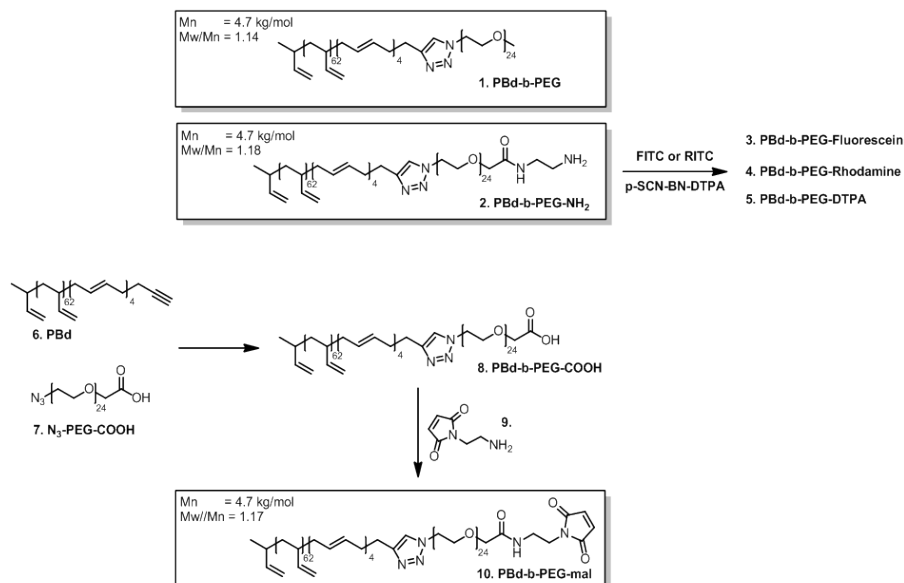


Figure 1: Overview of block copolymers and their synthesis.

3. PBd-b-PEG-Fluorescein

50 mg **2** (10 μ mol) was dissolved in 10 ml THF and 1 ml triethylamine was added. Fluorescein isothiocyanate (1.5 eq.) was added and allowed to react for 24 hours. Solvents were removed and product **3** was purified on a silica column, eluting with 8 % methanol in dichloromethane DCM (R_f = 0.5). The product was a single spot on TLC (8 % methanol in DCM) which appeared fluorescent. No further analysis was performed.

4. PBD-b-PEG-Rhodamine

50 mg **2** (10 μ mol) was dissolved in 10 ml THF and 1 ml triethylamine was added. Rhodamine isothiocyanate (1.5 eq.) was added and allowed to react for 24 hours. Solvents were removed and product **4** was purified on a silica column, eluting with 8 % methanol in DCM (R_f = 0.5). The product was a single spot on TLC (8 % methanol in DCM) which appeared fluorescent. No further analysis was performed.

8. PBd-b-PEG-COOH

80 mg **7** (0.08 mmol) and 800 mg **6** (2.6 eq. 0.21 mmol) were dissolved in 10 ml dry tetrahydrofuran under an argon atmosphere. The temperature was raised to 55 °C and 30 mg CuBr and 70 mg PMDETA were added. The reaction was allowed to proceed for 12 hours after which all solvents were removed. The crude product was dissolved in 50 ml dichloromethane and washed three times with 25 ml 0.33 M EDTA. The organic layer was dried over MgSO₄ and poured on a short silica column, which was eluted with dichloromethane. After all non-reacted polybutadiene was flushed off the product was eluted with 8 v % methanol in dichloromethane. After removal of all solvents 250 mg of the product was obtained in 60 % yield. The product was analyzed by size exclusion chromatography, showing a single size distribution with a shift toward higher hydrodynamic volume compared to polybutadiene (**6**). ¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.16 (m, 134H, CH₂CH), 2.11 (m, 67H, CH₂CH), 3.64 (m, 90H, CH₂CH₂O), 4.00 (s, 2H OCH₂COO), 4.94 (m, 134H, CHCH₂), 5.45 (m, 67H, CHCH₂). SEC (THF): Mn = 4.7 kg/mol, Mw/Mn = 1.17.

10. PBd-b-PEG-mal

100 mg **8** (21 μmol) was dissolved in 6 ml dichloromethane. 400 μl of a DIPCDI solution in DMF (1M) and 450 μl of a HOBT solution in DMF (1M) were added. After ten minutes, 20 mg of **9** (0.14 mmol) was added and the solution was stirred overnight. All dichloromethane was removed and 10 ml ice cold methanol was added at once. The precipitate was gently shaken to dissolve side products and excess of **9**. After 1 hour the suspension was centrifuged at 5000 rpm for 30 min. Methanol was decanted and a new aliquot was added to repeat the centrifuge step three times. The product was dried under vacuum to yield 60 mg of product. ¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.16 (m, 134H, CH₂CH), 2.11 (m, 67H, CH₂CH), 3.65 (m, 90H, CH₂CH₂O), 4.08 (s, 2H, OCH₂CON), 4.94 (m, 134H, CHCH₂), 5.45 (m, 67H, CHCH₂), 6.70 (s, 2H, maleimide); SEC (THF): Mw/Mn 1.17, Mn = 4.7 kg/mol.

Fluorescent, maleimide displaying polymersomes

8 mg **1** (1.7 μmol), 1 mg **3** or **4** (0.2 μmol) and 1 mg **10** (0.2 μmol) were dissolved in 200 ml THF. Polymersomes were formed by the slow addition of 0.8 ml PBS buffer pH 7.4. The samples were passed six times through a 200 nm syringe filter (Aerodisc) to yield polymersomes of ≈220 nm. To obtain polymersomes of around 160 nm the solution was extruded six times over a 100 nm filter (extrusion kit). The resulting opaque suspension was purified over a Sephadex G200 column (1.5 x 8 cm). The opaque fractions were combined and PBS was added to a total volume of 10 ml, i.e. a polymersome suspension containing 1 mg polymer per

ml. The final polymersome solution was analyzed by DLS to determine the mean size and polydispersity index.

Radiolabeled, maleimide displaying polymersomes

9 mg **1** (1.9 μmol), 0.1 mg **5** (0.02 μmol) and 1 mg **10** (0.2 μmol) were dissolved in 200 ml THF. Polymersomes were formed by the slow addition of 0.6 ml 0.1 M. 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid buffer of pH 5.5. The samples were passed three times through a 200 nm syringe filter to yield polymersomes of ≈ 250 nm. The solution was extruded six times over a 100 nm filter (extrusion kit) to obtain polymersomes of around 160 nm. The resulting opaque suspension was purified over a Sephadex G200 column (1.5 x 8 cm), eluting with MES buffer. The opaque fractions were combined and the mean particle size was determined by DLS.

To 0.2 ml of polymersomes, 25 MBq of $^{111}\text{InCl}$ was added and allowed to react for 20 minutes, after which the coupling efficiency was analyzed by ITLC-SG, developed in 0.1 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (pH 5.5)/0.1 M EDTA (1:1, v/v). The sample was purified over a PD10 desalting column, eluting with PBS buffer pH 7.4, and diluted with PBS to a total volume of 10 ml, i.e. a polymersome suspension containing 1 mg polymer per ml.

Gd loaded maleimide displaying polymersomes

9 mg **1** (1.9 μmol) and 1 mg **10** (0.2 μmol) were dissolved in 200 ml THF. Polymersomes were formed by the drop wise -while gently shaking- addition of 0.2 ml PBS buffer pH 7.4 containing 5 mg DTPA-Gd complex per ml. Then 0.6 ml of pure PBS buffer was added and the samples were passed six times through a 200 nm syringe filter (Aerodisc) to yield polymersomes of ≈ 220 nm. The resulting opaque suspension was purified over a Sephadex G200 column (1.5 x 8 cm). The opaque fractions were combined and PBS was added to a total volume of 10 ml, i.e., a polymersome suspension containing 1 mg polymer per ml. The final polymersome solution was analyzed by DLS to determine the mean size and polydispersity index.

Peptide Synthesis

All peptides were synthesised by means of standard fmoc chemistry. To the C terminus of all native peptide sequences (selected from the phage display library 5), cysteine was added to allow bioconjugation. All peptides were more than 90 % pure as analyzed by means of HPLC running in water/acetonitrile with 0.1 % TFA. The fraction of acetonitrile (0.1 % TFA) was increased from zero to hundred percent over 30 minutes. In all cases the right mass was found by means of Maldi-TOF (Table 1).

Code	Peptide sequence	Charge, pH 7	Mw theoretical
S37	H-HRRLSQWPLLKPC-OH	3	1633.96
G88	H-NPAGPSPAHIISC-OH	0	1262.61
G23	H-HLNILSTLWKYRC-OH	2	1646.95
scrambled G23	H-KISHLLNYRTWLC-OH	2	1646.95
TAT	H-YGRKKRRQRRRG-C-OH	8	1720.02

Table 1: Characterization of peptides.

Conjugation of peptides to polymersomes

0.5 mg TCEP was dissolved in 100 μ l PBS pH 7.4 and added to 1 mg peptide (excess). The solution was allowed to stand for 15 minutes, after which it was added to 1.5 ml of polymersomes. The coupling was allowed to proceed for three hours, after which the solution was transferred into a dialysis bag (Spectrapore MWCO 12-14 kD) and dialysed against PBS buffer for 24 hours (replacing PBS every 5-10 hours). The size, zeta potential and PDI of the polymersomes were determined (Table 2).

Peptide code	Size (nm)	PDI	ζ -potential (mV)
Non	220	0.11	-6.32
S37	220	0.11	5.26
G23	220	0.11	-1.7
TAT	220	0.11	9.62
G88	220	0.11	-14.59
scrambled G23	228	0.1	-2.83
G23 5 %	227	0.12	-3.21
G23-GdDTPA	230	0.09	-
G23 ¹¹¹ In	166	0.12	-
scrambled G23 ¹¹¹ In	166	0.12	-
G23 Rhodamine	165	0.12	-8.42
Non Rhodamine	164	0.1	-2.64

Table 2: Characterization of polymersomes.

References

- [1] R. Brinkhuis, K. Stojanov, P. Laverman, J. Eilander, I. S. Zuhorn, F. P. J. T. Rutjes, and J. C. M. van Hest, "Size dependent biodistribution and SPECT imaging of ^{111}In -labeled polymersomes," *Bioconjugate Chemistry*, p. 120402005029005, Apr. 2012.
- [2] P. van der Veken, E. H. C. Dirksen, E. Ruijter, R. C. Elgersma, A. J. R. Heck, D. T. S. Rijkers, M. Slijper, and R. M. J. Liskamp, "Development of a novel chemical probe for the selective enrichment of phosphorylated serine- and Threonine-Containing peptides," *ChemBioChem*, vol. 6, pp. 2271–2280, Dec. 2005.

Appendix C

Acknowledgements



Mostly frustrating, but occasionally fascinating, science moves through mysterious ways. Here in these last pages of my thesis I would like to express my appreciation to all of you that were with me in frustration and fascination during this PhD.

Above all, I would like to acknowledge my copromoter Dr. I. Zuhorn and promoter Prof. Dr. Dick Hoekstra for giving me the opportunity to conduct this PhD project. This thesis would not exist without their vital encouragement and support during my work at the Cell Biology department. Further, I would like to thank the members of the reading committee Prof.dr H.E. de Vries, Prof.dr ir W.E. Hennink and Prof.dr O.C.M. Sibon for taking the time to review this manuscript and for their comments.

I would also like to thank Prof. Dr. Fedor Jelezko in whose institute I completed writing this thesis.

As a part of the TIPharma project T5-105 this research was carried out in a collaboration with other departments and universities. I would like to acknowledge all our collaborators from Rijksuniversiteit Groningen, University Medical Center Groningen, Utrecht University, Leiden University, Radboud University Nijmegen Medical Center and Radboud University Nijmegen. My deepest gratitude I owe to René P. Brinkhuis for being a reliable and responsive team player.

My special gratitude to Ruby Kalicharan, Klaas Sjollema, Ben Giepmans and the entire section Molecular Imaging and Electron Microscopy for helping me in all steps from sample preparation till image analysis throughout the whole project and the acquisition of all images, described in statement No. 11.

I would like to acknowledge the GUIDE office for organizing courses and for the financial support provided for conference visiting.

Very warm and big thanks to the entire Membrane Cell Biology group. To Jan Willem and Wia, thank you for your always adequate and precise answers. Sven, I dedicate to you the fourth and fifth statements in the 'Stellingen' and thank you for helping me during the submission process of my first manuscript. To Karin, Ina, Anita, Jenny for technical help in the lab. To Jan for being everything: from English-Dutch translator to master in bike repairing. To Gerry, Tini and Yvon for solving for me the endless bureaucratic issues.

Sincere thanks for the nice time in the lab and outside to all former and current PhD students and postdocs, which I met in these four years: Bispo, Zia, Hande, Hershel, Marjolein, Cris, Kousei, Olaf, Kati, Ryuichi, Nai-Hua and Katica, that walked with me all the way. My dear office-mates, as we stayed

together in good times and bad times I owe sincere and earnest thankfulness to you. Peter, among everything else, you will always remain the guy, who swam next to me my first meters in 'deep waters'. Magda, it was a great pleasure to discuss with you this and that, a book or a theory, sometimes till early morning hours. Mira, I appreciate your help in tissue sample preparation.

My dear Inês, now when I am writing these lines Groningen seems so far away in the past, but nevertheless I still remember the wonderful moments we have had together. Your place, the delicious dinners you prepared and accompanied with endless scientific discussion, they were for me small salvation islands in the stressful daily life of a foreign PhD student. And Bram, your character appeared later in this story, but you are also included in this section. Please keep culturing mint in the garden, you never know when we may need it again. Thank you both. I am really grateful for having you as my paranymphs.

I cannot find words to express my gratitude to you, my dearest Boris. Even listing every contribution, that you made to have this thesis done, would be difficult. I truly appreciate the numerous weekends you spent formatting this book, but above all, it is the moral support and your understanding, that helped me during these years.

As for my best friend Borianna Varbanova I will keep it simple. Thank you for the help with the Bulgarian translation, but mostly for your friendship. We both know that more "words are very unnecessary ..."

Special thanks to my colleagues pharmacists, Tsvetan Shtinkov, Bisera Pilicheva, Radoslav Dechkov and Nikolaj Uzunov, that showed interest in my research and still keep in touch with me after all these years abroad.

At last, but surely not at least, I would like to acknowledge Ivan Uzunov, M.Sc in Pharmacy, as he was the first to awake in me interest in pharmacy and later pharmaceutical research.

На края бих искала да благодаря на моите родители и сестра ми за тяхната помощ и подкрепа.

